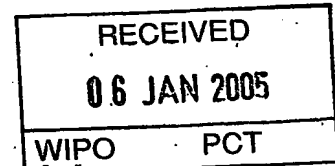


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

103 53 175.0

Anmeldetag:

14. November 2003

Anmelder/Inhaber:Professor Dr. Heinz Vollmers,
97084 Würzburg/DE;
Professor Dr. Hans Konrad
Müller - Hermelink,
97084 Würzburg/DE**Bezeichnung:**Humaner monoklonaler Antikörper mit fettsenkender
Wirkung**IPC:**

C 07 K, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**München, den 14. Dezember 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY

Faust

Zusammenfassung

- 5 Aufgereinigtes Polypeptid, dessen Aminosäuresequenz im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:3, wobei das Polypeptid low density lipoproteins (LDL), insbesondere LDL-Cholesterin, bindet und im menschlichen oder tierischen Organismus eine fett senkende Wirkung hat. Die Erfindung
- 10 beinhaltet die Verwendung des Polypeptides in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fett senkender Wirkung.

Humaner monoklonaler Antikörper mit fett senkender Wirkung

Die Erfindung betrifft ein aufgereinigtes Polypeptid (SAM-6.10) sowie dessen Verwendung in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fett senkender Wirkung.

Hintergrund der Erfindung

Bei einem an Überangebot an Cholesterin (Hyperlipoproteinämie) im Körper kommt es zur Verkalkung (arteriosklerotische Plaque) der Innenschichten der Gefäße und zu einer langsam fortschreitenden Verhärtung und Verdickung der Arterienwände. Im Extremfall droht ein Verschluss des Gefäßes oder beim Aufbrechen der Plaque Thrombusbildung. Die Arteriosklerose ist mit ihren Folgeerkrankungen (koronare Herzkrankheiten, Herzinfarkt, periphere arterielle Verschlusskrankheiten, Schlaganfall) noch immer die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Weit über die Hälfte aller für die medizinische Betreuung zur Verfügung stehenden finanziellen Mittel werden schätzungsweise für die Folgen der Arteriosklerose ausgegeben. Um die Ursachen der Arteriosklerose zu erklären, wurden verschiedene Theorien entwickelt, wobei die Lipidtheorie die meistbeachtete ist.

Allgemein läßt sich sagen: Je höher der LDL-Cholesteringehalt im Blut, desto höher das Risiko, an einer Gefäßverkalkung beispielsweise mit der Folge eines Herzinfarktes zu erkranken. Übergewicht und Hypercholesterinämie sind mit die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose.

Definitionen und Begriffe

Fette, wie z. B. Cholesterin, sind weder in Wasser noch in Blutflüssigkeit löslich. Um sie trotzdem in einzelne Körperregionen transportieren zu können, werden die Fette, sobald sie sich im Blut befinden, an bestimmte Eiweißkörper (Proteine) gebunden. Diese Verbindungen aus Lipiden (Fetten) und Proteinen (Eiweißen) werden als Lipoproteine bezeichnet.

Die „Lipoproteine“ des Plasmas sind hochmolekulare wasserlösliche Komplexe, die aus Lipiden (Cholesterin, Triglyceride, Phospholipide) und Apolipoproteinen bestehen. Das cholesterinhaltige Lipoprotein LDL-Cholesterin verursacht Arteriosklerose und wird auch das "böse" Cholesterin genannt.

„Cholesterin“ wird im Körper ubiquitär synthetisiert und ist ein wesentlicher Bestandteil von Zellmembranen und Lipoproteinen. Im Gegensatz zu den ebenfalls endogen synthetisierten Triglyceriden und Phospholipiden kann der Sterolring des Cholesterinmoleküls nicht mehr abgebaut werden; Cholesterin wird in der Leber zu Gallsäure umgewandelt oder unverändert über die Galle in den Darm ausgeschieden.

Im Plasma liegt Cholesterin zu 25-40% als freies (unverestertes) Cholesterin und zu 60-75% mit ungesättigten Fettsäuren verestert vor. Beide Formen zusammen werden als Gesamtcholesterin bezeichnet. Wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit wird Cholesterin im Plasma als Komplex mit Apolipoproteinen transportiert. Im Blut werden etwa 70 Prozent des Gesamt-Cholesterins mit Hilfe von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) transportiert.

„Triglyceride“ sind Ester von Glycerin mit drei Fettsäureresten. Analog zum Cholesterin werden auch die Triglyceride im Plasma aufgrund ihrer schweren Löslichkeit an Apolipoproteine gebunden transportiert.

5

„Lipoproteine“ werden in der Leber oder im Darm synthetisiert und transportieren im Blut fettlösliche Substanzen wie das Cholesterin.

10

Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt nach ihrer Dichte, man unterscheidet die fünf Dichteklassen: Chylomikronen, very low density lipoproteines (VDL), low density lipoproteines (LDL) und high density lipoproteines (HDL). Die Chylomikronen, deren physiologische Konzentration im Nüchternserum im Gegensatz zu jenen der anderen Lipoproteine sehr gering ist, sind Transportvehikel für exogene Glyceride. Die physiologische Verteilung der anderen Lipoproteine ist wie folgt: VLDL 10 %, LDL 70 % und HDL 20 %. VLDL sind die Vorläufer der LDL und Vehikel für den Transport von endogenen Glyceriden. LDL entstehen durch die Hydrolyse der VLDL. LDL und HDL sind beides Regulatoren der zellulären Cholesterinhomöostase, wobei HDL außerdem die Lipolyse (Spaltung von Triglyceriden in Glycerin und die freien Fettsäuren) regulieren. LDL haben einen Durchmesser von ca. 20 nm. HDL sind die kleinsten (7-10 nm) und eiweißreichsten Lipoproteinen.

15

20

25

30

„Apolipoproteine“ sind ein Bestandteil der Lipoproteine und umgeben, zusammen mit polaren Lipiden, als eine Art äußere Schale den aus hydrophoben Lipiden aufgebauten Lipoprotein-Kern. Mit Ausnahme von LDL, welches nur Apoprotein B enthält, weisen die einzelnen Lipoproteinklassen mehrere strukturell verschiedene Apolipoproteinklassen auf.

Lipoprotein-Transport

Cholesterin wird hauptsächlich durch die beiden Lipoproteinklassen LDL und HDL transportiert. LDL sind vor allem zuständig für den Cholesterintransport zu peripheren Zellen, die spezifische Rezeptoren für die LDL besitzen. Die HDL ermöglichen und beschleunigen den Abtransport von Cholesterin aus den extrahepatischen Zellen und Gefäßwänden und führen es der Leber zu.

Hinsichtlich der Pathogenität bei Lipidstoffwechselstörungen läßt sich allgemein sagen, dass LDL-Cholesterinerhöhungen in Verbindung mit HDL-Cholesterinverminderungen die ausgeprägteste Risikoerhöhung für Arteriosklerose darstellen. In der Pathogenese spielen LDL, deren Partikel wesentlich zur Bildung atherosklerotischer Plaques beitragen, und HDL daher eine gegensätzliche Rolle. Für die Beurteilung des Infarkttrisikos sind die Quotienten aus Gesamtcholesterin/HDL-Cholesterin und insbesondere LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin entscheidend. (Auf die schützende Wirkung des HDL-Cholesterins weisen auch epidemiologische Studien (Framingham-Studie) hin.) Die Folgeerkrankungen der Arteriosklerose beinhalten neben der koronaren Herzkrankheit und peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten insbesondere Infarkte in Herz und Gehirn (Schlaganfall).

Der „Scavenger-Pathway“ ist ein bekanntes Modell zur Erklärung der Aufnahme von Partikeln durch Zellen. Die Aufnahme fester Partikel (Gewebsstrümmen, Fremdkörper, Bakterien oder LDL-Plaques) in das Zellinnere von Phagozyten mit nachfolgendem intrazellulären Abbau erfolgt durch Phagozytose. Die zu Phagozytose befähigten Zellen werden auch als Fresszellen bezeichnet und bestehen überwiegend aus Gewebsmakrophagen sowie aus mobilen Blutmonozyten.

Bei der „Phagozytose“ kommt es nach Anlagerung der Partikel an die Zellmembranen der Phagozyten durch Bindung an membranständige Fc- und Komplementrezeptoren zur Aktivierung kontraktile Strukturen innerhalb des Zytoplasmas. Durch lokale Einstülpungen der Zellmembranen kommt es zum Einschluss der Partikel in Zytosolmavakuolen.

Die sog. Abräum-(Scavenger-)Phagozyten findet man im Lymphknoten in und entlang der zur Medulla (Mark) gehörenden Faserstränge. Während der Lymphpassage vom afferenten zum efferenten Ende des Lymphknotens werden partikuläre Antigene durch die zur Phagozytose befähigten Zellen entfernt.

Darüberhinaus ist bekannt, dass die Adhärenz an phagozytierende Zellen, wie polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen, durch die Anhaftung von Immunglobulinen (Ig) an die Oberfläche von Bakterien (und anderen Antigenen) vergrößert ist. Es wird vermutet, dass die gesteigerte Adhärenz durch Anlagerung des Fc-Anteils des Immunglobulins an die Fc-Rezeptoren der Phagozyten bewirkt wird. Nach dem „Schmackhaftmachen der Antigene durch Anhaftung von (od Bindung von) Antikörpern“ wird der Komplex aus Antigen und Antikörpern von den phagozytierenden Zellen schneller aufgenommen und verdaut. Die Beschichtung der Antikörperoberfläche mit Immunglobulinen wird auch als opsonin-bedingte (Fc) Adhärenz bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr.

Die an die Oberfläche von Bakterienzellen bindenden Antikörper sind in der Lage, bestimmte Komponenten der extrazellulären Flüssigkeiten zu fixieren. Im Überbegriff werden diese Komponenten als „Komplement“ bezeichnet. Tierversuche zeigten, dass die Phagozytose von mit Antikörpern beschichteten Zellen bei jenen Tieren mit

Al

Beschreibung der Erfindung

Die Wirkung der aus dem Stand der Technik bekannten Arzneimittel zur Senkung des LDL-Cholesterins beruht auf der Hemmung des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese (CSE). Als Cholesterinsynthesehemmer ist beispielsweise eine unter dem Handelsnamen Lipobay vermarktet Substanz bekannt geworden. Die Nebenwirkungen der CSE-Hemmer allgemein sind erheblich und schließen u.a. gastrointestinale Störungen, Schlafstörungen, Schwindel, Sehstörungen, allergische Reaktionen und Haarausfall ein. Lediglich im Versuchsstadium, und zwar nur bei schwerer familiärer Hypercholesterinämie, ist ein Ansatz der somatischen Gentherapie, der die Übertragung des Gens für den LDL-Rezeptor auf autologe Leberzellen zum Inhalt hat.

Übertragung des Gens für den LDL-Rezeptor auf autologe Leberzellen zum Inhalt hat.

Ein weitgehend nebenwirkungsfreier Stoff, der als Fettsenker wirkt, ist bislang nicht auf dem Markt. Insbesondere sind Antikörper, die eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation von Lipoproteinen induzieren, bislang nicht bekannt.

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Generierung eines neuen Stoffes bzw. Stoffklasse zur Herstellung eines Arzneimittels zur Reduktion des LDL-Cholesterins bei Mensch und Tier mit dem vorteilhaften Ziel der Verringerung des Infarktrisikos.

Zur Lösung der Aufgabe wird ein Polypeptid vorgeschlagen, dessen Aminosäuresequenz im wesentlichen mit den in SEQ ID NO: 1 und/oder SEQ ID NO: 3 angegebenen Aminosäuresequenzen identisch sind und das Polypeptid low density lipoproteins (LDL), insbesondere LDL-Cholesterin, bindet.

Der Kern der Erfindung besteht in der überraschend gemachten Beobachtung, dass ein gereinigtes Polypeptid, dessen Sequenz ganz oder teilweise der leichten (V_L) oder schweren Kette (V_H) eines humanen monoklonalen Antikörpers (SAM-6.10) entspricht, die Senkung des low density lipoproteins (LDL) bewirkt. Die Entdeckung dieser Eigenschaft, die den Einsatz des Polypeptids in entsprechender pharmazeutischer Formulierung als Fettsenker nahelegt, wurde im Rahmen der biochemischen Charakterisierung des Polypeptids gemacht. Vorteilhafterweise ist die Bindung des erfindungsgemäßen Polypeptids oder der Fragmente des Polypeptids an LDL und an VLDL, den Vorläufern der LDL, stärker als die Bindung an HDL. Aufgrund dieser Eigenschaft führt das erfindungsgemäße Polypeptid zu einem geringen Wert für den Quotienten aus LDL/HDL und minimiert somit das Infarktrisiko.

Die spezifische Bindung des Polypeptides an low density lipoproteins (LDL), bzw. LDL-Cholesterin wurde experimentell durch die ELISA-Methode nachgewiesen. Im gleichen Experiment konnte auch gezeigt werden, dass die Bindung des erfindungsgemäßen Stoffes an high density lipoproteins (HDL) schwach ist.

Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass insbesondere komplementäre Carbohydratstrukturen für die spezifische Bindung verantwortlich sind, d.h. die spezifische Erkennung der Lipoproteine durch das Polypeptid oder durch Fragmente des Polypeptids basiert auf kompli-

mentären Carbohydratstrukturen. Die Membrane eukaryotischer Zellen haben gewöhnlich einen Kohlenhydratanteil von 2 – 10 %, der von Zuckerresten der Glykolipide und Glykoproteine gestellt wird. Die Zuckerreste der Membranglykolipide und Membranglykoproteine sitzen immer auf der extrazellulären Seite der Membran. Da Zucker sehr hydrophil sind, dienen die Kohlenhydratgruppen der Glykoproteine möglicherweise dazu, die Glykoproteine in der Membran auszurichten. Von besonderer Wichtigkeit sind die Kohlenhydrate, die sehr vielfältige Strukturen ausbilden können, für die interzelluläre Erkennung.

Der erfindungsgemäße Antikörper umfasst die nach der gängigen Nomenklatur zur Beschreibung von Antikörper bezeichneten Gruppen V_L , V_H , F_v , F_c , Fab , Fab' , $F(ab')_2$. Die genannten Gruppen werden auch als Fragmente bezeichnet. Es ist durchaus möglich, dass ein einzelnes Fragment Ursache für die fettsenkende Wirkung des erfindungsgemäßen Polypeptids ist. In einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Stoffes handelt es sich um einen human monoklonalen Antikörper.

Als „funktionelles Fragment“ im Sinne der Erfindung wird ein Polypeptid bezeichnet, dass zumindest eine der biologischen Aktivitäten besitzt, die auch das gesamte Polypeptid aufweist. Bei Antikörpern ist z. B. bekannt, dass für die spezifische Bindung nicht alle CDR-Regionen erforderlich sind. D.h. die spezifische Bindung des Antikörpers kann z. B. durch nur eine CD-Region bewerkstelligt werden, obwohl insgesamt 3 CD-Regionen vorhanden sind. Die spezifische Bindung des Antikörpers an ein Antigen kann z.B. zur Induktion von Apoptose oder zur Inhibition der Zellproliferation führen. Die biologische Aktivität eines funktionellen Fragmentes kann durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Methoden, gemessen werden. Eine

Methode zur Messung der Interaktion zwischen Antikörpern und LDL, insbesondere LDL-Cholesterin, ist die ELISA-Methode.

Die complementarity-determining regions (CDRs) der Polypeptidsequenz beinhaltet die Aminosäuresequenz, die im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1), Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) und Gln-Ala-Trp-Asp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) der SEQ ID NO 1 der variablen Region der leichten Kette (V_L); siehe auch Figur 2.

Die complementarity-determining regions (CDRs) der Peptidsequenz beinhalten Aminosäuresequenzen, die im wesentlichen identisch sind mit Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1), Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) und Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) der SEQ ID NO 3 der variablen Region leichten Kette (V_H); siehe auch Figur 4.

Als „im wesentlichen identisch“ wird ein Polypeptid oder eine Nukleinsäuresequenz bezeichnet, die zumindest 75 %, 80 %, 85 %, oder 90 % mit der als Referenz angegebenen Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 1 und 3) oder mit der Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NO: 2 und 4) aufweist. In einer Weiterbildung des Polypeptids bzw. der Nukleinsäuresequenz sind mindestens 95 %, 98 %, 99 % oder 100 % Identität im Vergleich zu den angegebenen Referenzen nachweisbar. Für Polypeptide wird die Länge des Vergleichsabschnitts im allgemeinen mindestens 5, 10, 15 oder wünschenswerterweise mindestens 20 oder 25 aufeinander folgende Aminosäuren aufweisen.

Das erfindungsgemäße Polypeptid ist generierbar durch ein Verfahren, das unter dem Namen Hypridoma-Technik (Köhler, Millstein,

5

10

25

30

5

Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass das erfindungsgemäße Polypeptid zur Herstellung des Arzneimittels bevorzugt in gereinigter Form eingesetzt wird, wobei zur Reinigung sämtliche dem Fachmann bekannten Verfahren (z.B. Affinitätschromatographie, Gelfiltration) in Frage kommen. Als Indikation des erfindungsgemäßen Stoffes steht des fettsenkende Wirkung im Vordergrund, wobei insbesondere die selektive Senkung von LDL bzw. LDL-Cholesterin hervorzuheben ist. Aufgrund der Eigenschaft LDL stärker zu binden als HDL bewirkt das erfindungsgemäße Polypeptid einen geringen Wert für den Quotienten aus LDL/HDL und minimiert somit das Infarktrisiko.

10

15

Die Hilfs- und Trägerstoffe zur Herstellung eines Arzneimittels sind dem Fachmann bekannt und können nach gängiger Praxis hergestellt werden (siehe Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

Material und Methoden

Immortalisierung von Lymphozyten und Primärtestung der Antikörper

Zur Immortalisierung werden die Lymphozyten mit dem Heteromyelom HAB-1 (Faller et al., 1990) nach Standardprotokoll fusioniert und kultiviert. Kurz zusammengefasst, Lymphozyten werden mit HAB-1 Zellen mittels PEG verschmolzen. Die Triome werden auf vier 24-Lochplatten ausgesät. Die durchschnittliche Wachstumsfrequenz beträgt 80-90%, 50% der wachsenden Klone sezernieren Immunglobuline. Die erste Austestung der sezernierten humanen monoklonalen Antikörper erfolgt im ELISA, um den Isotyp zu ermitteln. Nachfolgend können die humanen monoklonalen Antikörper immunhistochemisch, genetisch, biochemisch und molekularbiologisch analysiert werden.

Benötigte Medien:

- RPMI 1640 (Firma PAA) ohne Zusätze
- RPMI 1640 mit HAT-Zusatz (HAT-Supplement, Firma PAA) sowie 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin
- HAB-1 (Fusionspartner) zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen
- zentrifugieren 5 min bei 1500U/min
- eingefrorene Lymphozyten (aus Milz, Lymphknoten oder Blut) auftauen und zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen, ebenfalls zentrifugieren
- beide Pellets jeweils in 10 ml RPMI ohne Zusatz aufnehmen und in der Neubauer-Zählkammer zählen
- im Verhältnis von 1:2 – 1:3, Hab-1 zu Lymphozyten, fusionieren

- die Zellpellets nach dem zweiten Waschvorgang zusammen geben, mischen und 8 min bei 1500 U/Min zentrifugieren
- das zuvor bei 37°C aufgewärmte PEG (Polyethylene Glycol 1500, Firma Roche) vorsichtig tröpfelweise auf das Pellet unter leicht rotierenden Bewegungen des 50 ml Röhrchens laufen lassen
- leicht resuspendieren und dann genau 90 sek. im Wasserbad bei 37°C rotieren lassen
- danach wird das PEG mit RPMI ohne Zusätze herausausgewaschen (zwei volle 10er Pipetten)
- zentrifugieren 5 min bei 1500 U/min
- 24 Well-Platten ausplattieren mit 1ml pro Well RPMI mit HAT-Zusatz (HAT= Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)
- das Pellet lösen in RPMI mit HAT-Zusatz
- jeweils einen halben ml der Zellen in ein 24 Well pipettieren
- Fusionsplatten in den Brutschrank stellen
- wöchentlich Mediumwechsel mit RPMI mit HAT-Zusatz

Reinigung des Antikörpers SAM-6.10

Reinigung von Kulturüberstand durch Kationenaustauschchromatographie über FPLC

Die den IgM-Antikörper SAM-6.10 produzierenden Hybridomzellen wurden hierzu in einem speziellen serumfreien Zellkulturmedium (AIMV-Medium, Gibco) herangezogen und der Gehalt an IgM im Kulturüberstand nephelometrisch bestimmt. Zur Aufreinigung wurde der Kulturüberstand auf einen pH-Wert von auf 5,9 eingestellt und die Lösung filtriert. Zur Bindung wurde eine spezielle Kationen-Säule (HiTrap™ SP FF column, 5 ml, Amersham Bioscience) verwendet. Die Säule wurde zu Beginn der Reinigung mit filtriertem Puffer A (20 mM Phosphatpuffer, pH 5,9) äquilibriert. Anschließend wurde der auf

Eis gekühlte Kulturüberstand mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftrag des Überstandes wurde die Säule für 20 min und einer Flussrate von 2 ml/min mit Puffer A bis zu einer Basislinienkonstanz gewaschen um alle nicht gebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde der an die Säule gebundenen Antikörper durch Beimischung von Puffer B (20 mM Phosphatpuffer, 1M NaCl, pH 8,0) eluiert und in Fraktionen gesammelt. Der Gehalt an SAM-6.10 Antikörper (IgM) in den einzelnen Fraktionen wurde im Folgenden nephelometrisch bestimmt und die Reinheit und Intaktheit des gereinigten Antikörpers über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse überprüft.

Tierexperimente zum Nachweis der *in-vivo* Wirkung des Antikörpers SAM.10

Experiment 1: 500µg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurden intraperitoneal injiziert. Die LDL Konzentration im Blutserum wurde nach 2 Tagen gemessen (Methode siehe unten).

Experiment 2: wie oben

Experiment 3: 1mg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurden intraperitoneal injiziert. Die LDL Konzentration im Blutserum wurde nach 14 Tagen gemessen.

Kontrolle A: Normalwerte Kontrollmaus

Kontrolle B: Normalwerte Kontrollmaus

Die Serumkonzentration von LDL ist bei den mit SAM-6.10 behandelten Mäusen bis zu 95% reduziert (siehe Figur 5).

Toxizität

500µg bzw. 1mg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurde Mäusen intraperitoneal injiziert.

- keine akute Toxizität
- keine latente Toxizität (Zeitraum 3 Monate).

Die Organe der getöteten Mäuse aus Experiment 1, 2 und 3 (siehe oben) wurden entnommen und untersucht: Leber, Lunge, Herz, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Nieren, Magen und Gehirn wiesen keine morphologischen Veränderungen auf. Darüber hinaus wurden die Organe immunhistochemisch auf eventuelle Lipideinlagerungen untersucht. Die Färbung mit Sudan III zeigte in keinem Organ eine Einlagerung von Lipiden.

Die Organe der getöteten Mäuse wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Färbung erfolgte mit dem Farbstoff Sudan III nach folgendem Protokoll:

Sudan III-Färbung auf Paraffinschnitten

Entparaffinierung:

- Xylol 1 5 min
 - Xylol 2 5 min
 - 100% Ethanol 1 5 min
 - 100% Ethanol 2 5 min
 - Methanol 70ml + H₂O₂ 500µl 5 min
 - 90% Ethanol 1 3 min
 - 90% Ethanol 2 3 min
 - 80% Ethanol 1 3 min
 - 80% Ethanol 2 3min
 - 70% Ethanol 1 3 min
 - 70% Ethanol 2 3 min
-
- Schnitte in PBS stellen
 - Schnitte 15 min mit Sudan III inkubieren

- waschen mit Aqua dest.
- 1 x in 60% Isopropanol eintauchen
- waschen mit Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Hämalaun für 6 min
- Schnitte 10 min wässern, waschen mit Aqua dest und mit Glyce-
ringelatine eindeckeln

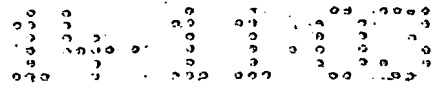
Bestimmung von Lipiden in Blutproben

Die Messung der verschiedenen Lipide im Blutserum wurde automa-
tisch mit dem MODULAR D P800 Gerät (Roche) vorgenommen.

Die Bestimmung des LDL-Cholesterinwertes erfolgte durch eine en-
zymatische, kolorimetrische Methode (CHOD/PAP) ohne Probenvor-
behandlung.

Testprinzip:

HDL, VLDL und Chylomikronen werden von einem Detergenz 1 spe-
zifisch hydrolysiert. Das in diesen Lipoproteinen freigesetzte Chole-
sterin reagiert sofort durch die enzymatische Wirkung der Cholesteri-
nesterase (CE) und Cholesterinoxidase (CHOD) und es entsteht
Wasserstoffperoxid. Dies bildet mit 4-Aminoantipyridin in Anwesen-
heit einer Peroxidase (POD) ein farbloses Produkt. Während dieses
Schrittes bleiben die LDL-Partikel intakt. Die Reaktion von LDL-
Cholesterin wird durch Zugabe von Detergenz 2 und der Kupplungs-
substanz N,N-bis(4-Sulfobutyl)-m-toluidin (DSBmT) ausgelöst. Das
zweite Detergenz setzt Cholesterin in den LDL-Partikeln frei. In der
enzymatischen Reaktion wird in Anwesenheit der Kupplungssub-
stanz ein Farbstoff gebildet. Die Intensität des gebildeten roten
Chinoniminfarbstoffs ist direkt proportional zur LDL-Cholesterin-
Konzentration. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei
552 nm bestimmt.



ELISA (LDL/HDL)

- ELISA-Platte vorbeschichten mit LDL (Lipoprotein Low Density from Human Plasma, Firma Sigma, 10µg/ml in PBS) oder HDL (Human HDL, Firma Chemicon, 10µg/ml in PBS) → 50 µl pro well
- 5 - Platte abdecken und über Nacht bei 4°C lagern
- am nächsten Tag Platte 2 x mit PBS waschen
- 100 µl RPMI in jedes well pipettieren. und für 1h bei RT inkubieren
- danach 2 x mit PBS waschen
- 10 - 50 µl der jeweiligen Positivkontrollen in je 2 wells pipettieren. (Doppelbestimmung)
- Positivkontrolle: Mab to human LDL Mouse IgG2a 1:1000 in PBS
- daneben 50 µl RPMI als Negativkontrolle (Doppelbestimmung)
- 50 µl der Proben (Überstand SAM6.10) (Doppelbestimmung) nebeneinander pipettieren
- 15 - 1h im Brutschrank inkubieren
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit PBS/0,05% Tween waschen
- 2 x mit PBS waschen
- 20 - 50 µl der jeweiligen 2. AK (Peroxidase konjugiert.) pipettieren: rabbit anti human IgM 1:1000 in PBS/0,05% Tween (für SAM-6.10)
- rabbit anti Mouse IgGs 1:1000 mit PBS Tween (für Positivkontrolle LDL)
- 25 - 1h im Brutschrank inkubieren
- 2 x mit PBS waschen
- 1 x mit PBS/0,05% Tween waschen
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit Citratpuffer waschen

- zum Auswerten: OPD Tablette (Dako, Hamburg) in Citratpuffer lösen + H_2O_2 (3 ml Citratpuffer + eine Tabl. + 5 μ l H_2O_2)
- 50 μ l Farbstoff in jedes Well pipettieren
- bei positiver Reaktion (gelbe Färbung) mit 10 μ l 3 M H_2SO_4 stoppen

Erläuterung der Figuren

Figur 1 zeigt die Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO 1) der variablen Region der leichten Kette (V_L).

Figur 2 zeigt die Nucleotidsäuresequenz (SEQ ID NO 2) der variablen Region der leichten Kette (V_L). Die complementarity-determining regions (CDR) sind durch Querstriche gekennzeichnet und im wesentlichen identisch mit den Nucleotiden 67-99 (CDR1), 145-165 (CDR2) und 262-288 (CDR3) von SEQ ID NO 2.

Figur 3 zeigt die Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO 3) der variablen Region der schweren Kette (V_H).

Figur 4 zeigt die Nucleotidsäuresequenz (SEQ ID NO 4) der variablen Region der schweren Kette (V_H). Die complementarity-determining regions (CDR) sind durch Querstriche gekennzeichnet und im wesentlichen identisch mit den Nucleotiden 91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) und 295-330 (CDR3) von SEQ ID NO 4.

Figur 5 dient zum Nachweis der Wirkung des erfindungsgemäßen Stoffs. Figur 5 soll jedoch nur zur Erläuterung und nicht zur Einschränkung der Erfindung dienen. Figur 5 zeigt die *in vivo* Wirkung von SAM-6.10. Im beschriebenen Tierexperiment mit Mäusen kommt es zu einer Reduktion der Serumkonzentration von LDL nach SAM-6.10 Behandlung um bis zu 95 %.

Patentansprüche

5

1. Gereinigtes Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet**, dass
 - die Aminosäuresequenz des Polypeptids im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und/oder SEQ ID NO:3, und
 - das Polypeptid low density lipoproteins (LDL), insbesondere LDL-Cholesterin, bindet.

10

15

2. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bindung des Polypeptides oder der Fragmente des Polypeptids an low density lipoproteins (LDL) und very low density lipoproteins (VLDL) stärker ist als die Bindung an high density lipoproteins (HDL).

20

3. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid oder Fragmente des Polypeptids und die im menschlichen und tierischen Körper vorkommenden low density lipoproteins (LDL) komplementäre Carbohydrat-Strukturen aufweisen.

25

4. Gereinigtes Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein Antikörper oder ein funktionelles Fragment davon ist.

30

5. Gereinigtes Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein funktionelles Fragment einer der nachfolgend genannten Gruppen von V_L , V_H , F_v , F_c , Fab , Fab' , und $F(ab')_2$ ist.

- 5
6. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aminosäuresequenz der variablen Region der leichten Kette (V_L) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 1 und/oder die Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren Kette (V_H) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 3.
- 10
7. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nucleinsäuresequenz der variablen Region der leichten Kette (V_L) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 2 und/oder die Nucleinsäuresequenz der variablen Region der schweren Kette (V_H) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 4.
- 15
8. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die genannten Fragmente ein Fragment der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO 1 oder der SEQ ID NO 3 beinhalten.
- 20
9. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die genannten Fragmente ein Sequenzfragment enthalten, das im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3.
- 25
10. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 1.

11. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 3.
- 5 12. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid Nucleinsäuresequenzen beinhaltet, die im wesentlichen identisch sind mit den Nucleotiden 67-99 (CDR1), 145-165 (CDR2) und 262-288 (CDR3) of SEQ ID NO 2.
- 10 13. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid Nucleinsäuresequenzen beinhaltet, die im wesentlichen identisch sind mit den Nucleotiden 91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) and 295-330 (CDR3) of SEQ ID NO 4.
- 15 14. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid von einer hinterlegten Hybridomzelllinie, die am 7. November 2003 mit der Bezeichnung „SAM 6.10“ bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) hinterlegt wurde, **exprimiert wird**.
- 20 15. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 beinhaltet.
- 25 16. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3 beinhaltet.
- 30 17. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und/oder SEQ ID NO:3 beinhaltet.

- 5 18. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und/oder SEQ ID NO:3 beinhaltet und von der Hybridomzelllinie, die am 7. November 2003 mit der Bezeichnung „SAM 6:10“ bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) hinterlegt wurde, exprimiert wird.
- 10 19. Complementarity-determining regions (CDR) oder funktionelle Fragmente davon, welche die Aminosäuresequenzen Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1) oder Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) oder Gln-Ala-Trp-Asp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) of SEQ ID NO: 1 und/oder Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1) oder Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) oder Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) SEQ ID NO: 3.
- 15 20. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 13 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid nach dem in Anspruch 21 beanspruchten Verfahren generierbar ist.
- 20 21. Verfahren zur Generierung eines Antikörpers nach der Hybridomtechnik, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hybridom-Zellen durch Fusion der Heteromyelom-Zellen HAB-1 sowie deren Subklone mit B-Lymphozyten gewonnen werden, welche aus humanen Milzen, Lymphknoten oder Blut entnommen sind.
- 25 22. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 13 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein monoklonaler Antikörper ist.
- 30

23. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ein humaner monoklonaler Antikörper ist.

5

24. Verwendung eines Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fettsenkender Wirkung.

10

25. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels zur Senkung von low density lipoproteins (LDL) im Blut.

15

26. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels zur Senkung von LDL-Cholesterin.

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad
Prof. Dr. Vollmers, H. Peter

<120> Humaner monoklonaler Antikörper

<160> 4

<210> 1

<211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<223> Aminosäure-Sequenz der variablen Region der leichten Immunglobulinkette (V_L) des Antikörpers SAM-6.10

<400> 1

```

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly
1      5      10      15
Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys
20     25     30
Tyr Ala Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu
35     40     45
Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
50     55     60
Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser
65     70     75
Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp
80     85     90
Asp Ser Ser Ile Val Val
95

```

Figur 1

<210> 2
 <211> 288
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<223> Nukleotid-Sequenz der variablen Region der leichten Immunglobulinkette (V_L) des Antikörpers SAM-6.10

<400> 2

tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tca gtg tcc gtg tcc cca gga	45
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly	
1 5 10 15	

CDR1

cag aca gcc agc atc acc tgc tct gga gat aaa ttg ggg gat aaa	90
Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys	
20 25 30	

tat gct tgc tgg tat cag cag aag cca ggc cag tcc cct gtg ctg	135
Tyr Ala Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu	
35 40 45	

CDR2

gtc atc tat caa gat agc aag cgg ccc tca ggg atc cct gag cga	180
Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg	
50 55 60	

ttc tct ggc tcc aac tct ggg aac aca gcc act ctg acc atc agc	225
Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	

ggg acc cag gct atg gat gag gct gac tat tac tgt cag gcg tgg	270
Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp	
80 85 90	

CDR3

gac agc agc att gtg gta	288
Asp Ser Ser Ile Val Val	
95	

Figur 2

36

30

Figur 3

<210> 4
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<223> Nukleotid-Sequenz der variablen Region der schweren Immunglobulinkette (V_H) des Antikörpers SAM-6.10

<400> 4

cag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg		45
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly		
1				5					10					15		

agg	tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttc	agt		90
Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser		
				20					25					30		

CDR1

agc	tat	gct	atg	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg		135
Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Glu	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		
				35					40					45		

CDR2

gag	tgg	gtg	gca	gtt	ata	tca	tat	gat	gga	agc	aat	aaa	tac	tac		180
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr		
				50					55					60		

gca	gac	tcc	gtg	aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc		225
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser		
				65					70					75		

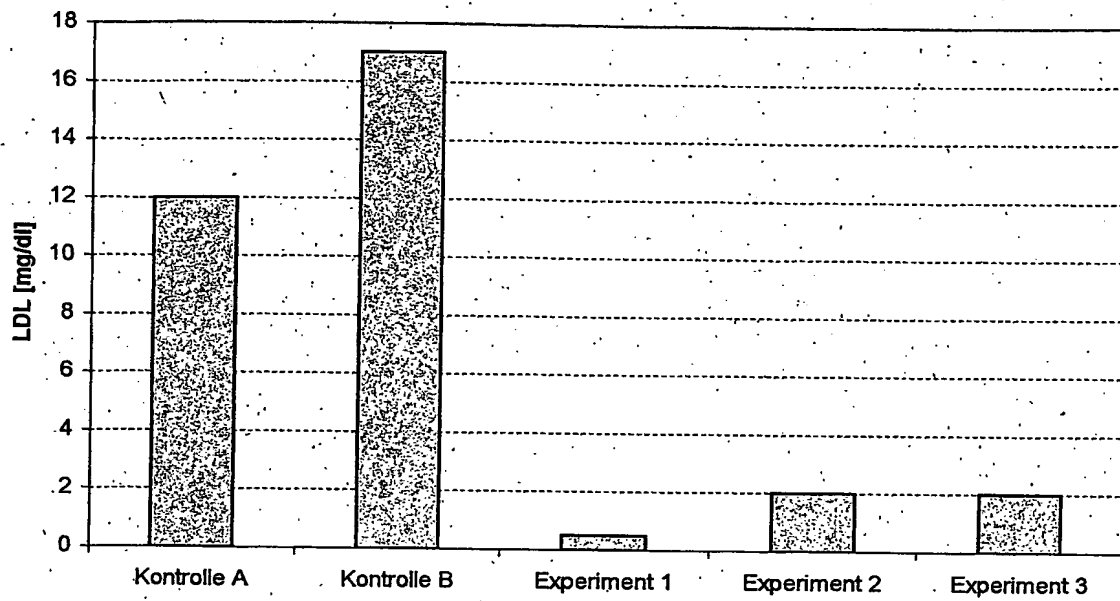
aag	aac	acg	ctg	tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gct	gag	gac		270
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp		
				80					85					90		

CDR3

acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	gcg	aga	gat	cgg	tta	gca	gtg	gct	ggt		315
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Gly		
				95					100					105		

aaa	act	ttt	gac	tac												
Lys	Thr	Phe	Asp	Tyr												
																110

Figur 4



Figur 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.